人组氨酸磷酸酶蛋白 PHPT1 的细胞定位及其对细胞层状伪足形成的影响

徐安健[1*]，李艳萌[1]，李斯文[1]，乌姗娜[2]，张蓓[1]，黄坚[1*]

1. 首都医科大学附属北京友谊医院 科研实验中心 北京 100875

2. 首都医科大学附属北京友谊医院 临床检验中心 北京 100875

摘要：目的：获取人组氨酸磷酸酶蛋白 PHPT1 基因，并构建其 C 端 GFP 融合的真核表达载体，通过瞬时转染观察融合蛋白在细胞内的表达和定位，并研究其定位与细胞层状伪足形成的关系。方法：以人宫颈癌细胞株 HeLa cDAN 为模板，PCR 扩增 PHPT1 的全长编码基因，克隆到 pEGFP-N2 载体中，构建 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体，利用脂质体将构建的载体转染到 HeLa 细胞中，用激光共聚焦扫描显微镜观察 C 端 GFP 连接的 PHPT1 的细胞定位，并进一步探讨其定位与细胞层状伪足形成的关系。结果：成功构建了 PHPT1 的 GFP 融合表达载体 pEGFP-N2-PHPT1，并在 HeLa 细胞中检测到了融合蛋白的表达，发现其定位与细胞层状伪足的形成密切相关，并可直接影响细胞的运动能力。结论：GFP 融合形式表达的 PHPT1 蛋白在细胞质和细胞核中均有表达，并且定位于细胞层状伪足的前沿，影响细胞层状伪足的形成，从而影响细胞运动。

关键词 PHPT1；GFP 融合表达；定位分析；层状伪足

通讯作者：徐安健 Email: xuanjian1981@sina.com；黄坚 Email: hjlq123@163.com

人组氨酸磷酸酶蛋白 PHPT1（也称为 PHP14）是在脊椎动物中发现的第一个蛋白组氨酸磷酸酶[1,2]。目前，对它的生物学功能还知之甚少。除发现其具有组氨酸磷酸酶功能外，其可能还具有信号传导的功能，并在肿瘤中发挥作用[3-5]。

PHPT1 能与多种胞内分子相互作用，如 ATP 循环裂解酶和 G 蛋白的 β 亚基，以及 HSP90α [6-8]，从而发挥其部分生理生化功能。从这些与其相互作用的分子定位信息中，我们虽然能得出一些 PHPT1 的部分亚细胞定位信息，但其具体的亚细胞定位目前还未见报道。

我们前期的研究已经采用免疫组化的方法，对 PHPT1 在肺癌肿瘤组织中的分布情况进行了描述[9]，但由于免疫组化方法分辨率不高，并不能细致观察 PHPT1 的准确亚细胞定位。为了进一步了解 PHPT1 在细胞中的定位情况，从而为更全面的阐明其在细胞中的功能提供参考信息，本研究通过分子生物学的手段，构建了 PHPT1 的 C 端 GFP 真核表达载体，转染人子宫颈癌细胞 HeLa，并采用激光共聚焦显微镜观察，明确了 PHPT1 的亚细胞定位。此外，

本研究还进一步深入探讨了 PHPT1 的细胞定位与细胞层状伪足形成以及细胞运动的关系。

1. 材料和方法

1.1 试剂和材料

大肠杆菌 DH5α 和人子宫颈癌细胞 HeLa 由本实验室保存; pEGFP-N2 质粒购自 Pharmarcia 公司; LipofectamineTM 2000 购自美国 INVITROGEN 公司; Pyrobest TM DNA 聚合酶、DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 DL2000 分子量 Marker 购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; CK-666、氨苄青霉素购自 Sigma 公司; 其它常规试剂均为进口或国产分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 PHPT1 全长编码基因的 PCR 扩增

根据 Genbank 数据库中 PHPT1 蛋白的 mRNA 序列，在其编码序列的两端分别设计用于构建 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体的特异性引物，其序列如下(划线部分为所加酶切位点) :

pEGFP-N2-PHPT1：

正义引物：5’- TTA**CTCGAG**ATGGCGGTGGCGGACCT-3’

Xho I

反义引物：5’- ATC**GGTACC**GGTAGCCGTCGTTAGC-3’

Kpn Ⅰ

引物序列由上海英俊生物技术有限公司合成。以子宫颈癌细胞 HeLa cDNA 为模板，PCR 扩增 PHPT1 的基因编码序列，反应条件如下：94℃预变性 5min；94℃ 30s，58℃退火 30 s，72℃延伸 30s，循环 30 次；在 72℃再延伸 7min。扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶上分离目的基因，用 B 型小量 DNA 片段快速凝胶回收试剂盒进行回收。

1.2.2 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体的构建

分别将回收所得的 PCR 产物与 pEGFP-N2 载体用 Xho I 和 Kpn Ⅰ 内切酶在 37° C 酶切 5hr。酶切完毕经电泳分离后进行回收。调整酶切完全并纯化回收的片段与载体的浓度，用 T4 连接酶在 16℃连接过夜（12hr-16hr）。将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 。挑取抗氨苄青霉素阳性克隆，一部分进行菌落 PCR，另一部分提取质粒，并使用双酶切进行鉴定分析。选取含目标片段的单克隆菌落递交上海英俊生物技术公司进行测序鉴定。

1.2.3 细胞培养、转染和激光共聚焦扫描显微镜观察

在六孔板中每孔接种 2×10^5 个/mL 的人子宫颈癌细胞 HeLa 细胞，并在 37℃ 5%二氧

化碳培养箱中培养 18～24 h，使细胞达到对数生长期，达到 70%～80%的细胞密度。将 6 孔板内的含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基更换为无血清 DMEM 培养基，并分别用 4μg 已测序验证的 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体用 LipofectamineTM 2000 真核转染试剂转染，然后继续培养 4～6 h。在将细胞培养液换成新的含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基后，放入二氧化碳培养箱中培养 24h。随后用 pH7.4 的 PBS 洗涤细胞，3.7%多聚甲醛固定 20min，0.2%的 Triton X- 100 通透 5 min，用 DAPI 于室温下避光标记 8min 后封片，用激光共聚焦扫描显微镜观察。

1.2.4 活细胞成像

用 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体转染 HeLa 细胞 24 个小时后，将细胞接种到显微镜培养皿中。然后将细胞过夜培养。加入 CK-666 后每 1 分钟获取一次图像。

1.2.5 划痕修复实验

La 细胞种 6 孔板（1× 10^6 cell/well），37 ℃，5% CO_2 培养 24 h 至细胞达 100%汇合度；用黄色枪头划痕，无血清培养基冲洗两遍去除漂起的细胞，并换上新鲜的含血清培养基，拍照记为 0 h；继续培养，并在不同时间点拍照。

2 结果

2.1 PHPT1 全长编码基因的 PCR 扩增

以 HeLa 细胞的 cDNA 为模板，用 pEGFP-N2 的 PHPT1 扩增引物，PCR 扩增分别用于 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体构建的全长 PHPT1，分别成功获得了分子量大小为 378bp 的目的片段（图 1）。

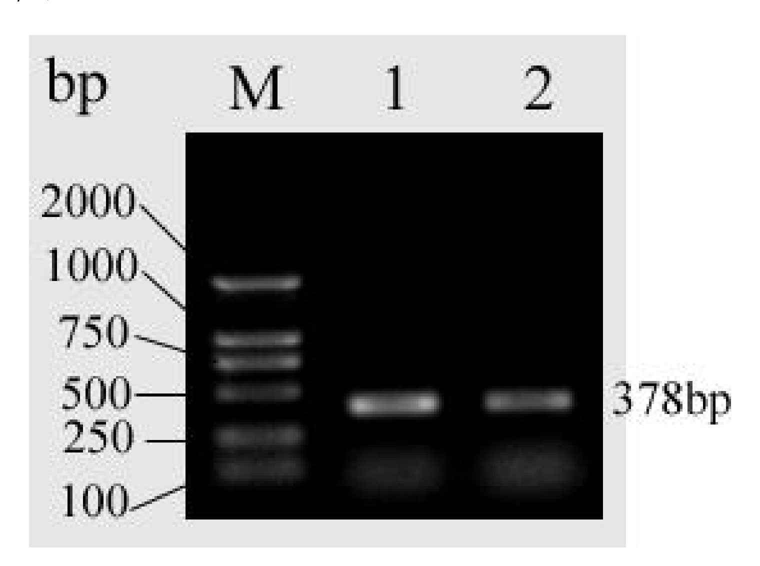


图 1. PHPT1 全长编码基因的 PCR 扩增。Fig 1. The full length of PHPT1 by PCR amplification. M: DNA ladder 2000; 1 和 2: PCR product of PHPT1 for pEGFP-N2.

2.2 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体的构建和双酶切分析鉴定

构建 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体，并得到阳性大肠杆菌 DH5α 菌落后，挑取部分菌落，分别用 pEGFP-N2 的 PHPT1 扩增引物进行菌落 PCR，初步鉴定其中是否含有成功构建的 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体。结果如图 2，在阳性大肠杆菌 DH5α 菌落中，成功扩增出 PHPT1 片段。

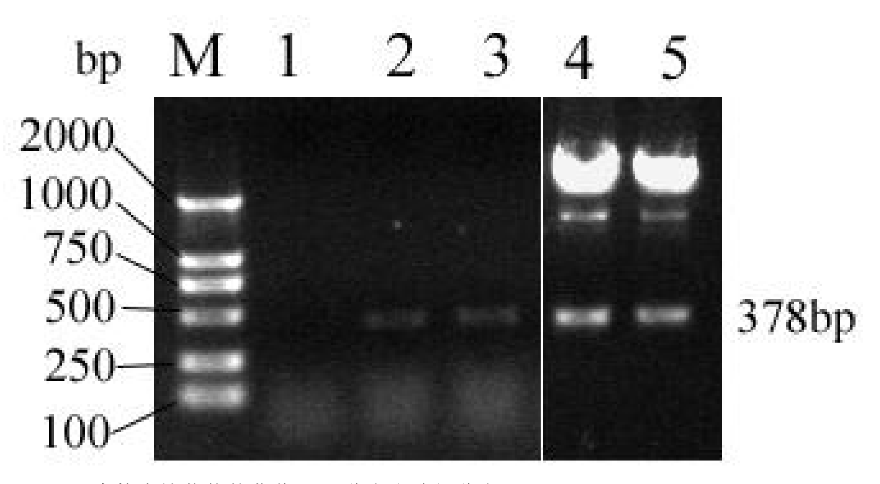


图 2. pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体的菌落 PCR 鉴定和酶切鉴定。Fig2. Colony PCR identification and Restriction enzyme identification of pEGFP-N2-PHPT1 vectors. M: DNA ladder 2000; 1. Empty vector; 2 and 3. Colony PCR identification for pEGFP-N2-PHPT1 vector; 4 and 5. Restriction enzyme identification of pEGFP-N2-PHPT1 vector.

分别将从阳性大肠杆菌 DH5α 菌落中提取的 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体用 Xho I 和 Kpn I 酶切，得到了 378bp 的条带（图 2），与预期吻合。将克隆成功的融合质粒递交上海英俊生物科技有限公司进行序列测定，测序结果与人 PHPT1 的 ORF 序列完全一致（结果未列出）。

2.3 PHPT1 的细胞内定位

将 pEGFP-N2-PHPT1 真核表达载体用 LipofectamineTM 2000 真核转染试剂转染 HeLa 细胞，并观察 C 端融合 GFP 的 PHPT1 蛋白在细胞中的表达情况（图 3）。

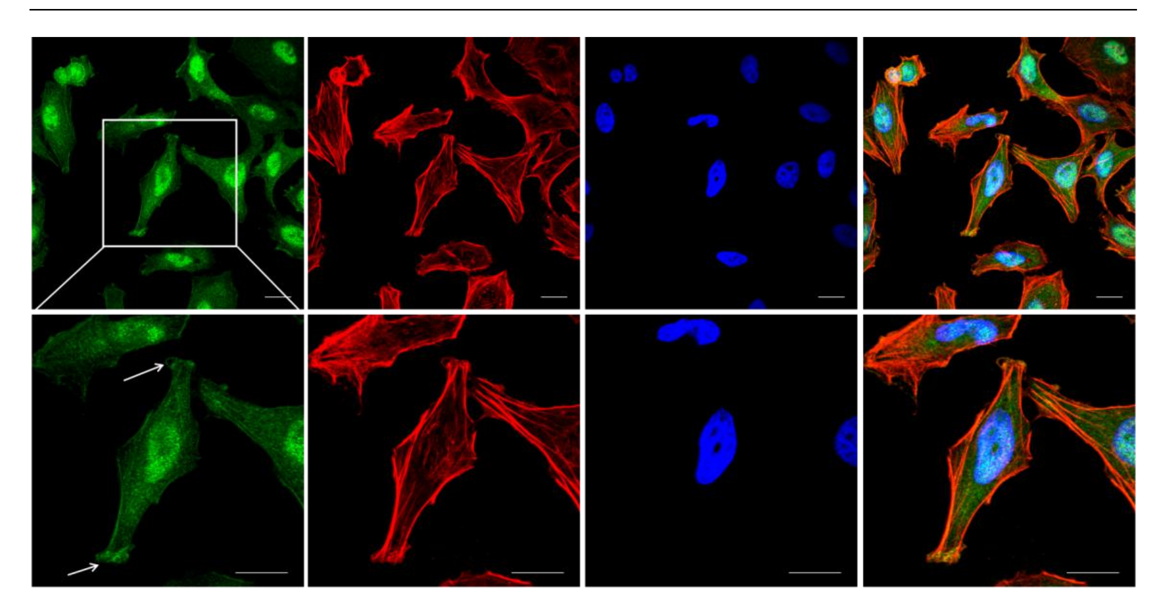


图 3. C 端融合 GFP 的 PHPT1 在 HeLa 细胞中的定位。Fig3. The location of GFP-N-PHP and GFP-C-PHPT1 fusion protein in HeLa cells. Green: PHP14, Red: F-actin, Blue: DAPI. Scale bar 20 μm (up panel) and 40 μm (low panel).

从图中可以看出，融合 GFP 的 PHPT1 蛋白显示出细胞核和细胞质内的定位表达。更特异地，其还定位于细胞的层状伪足的前沿（图 3 中箭头所指）。

2.4 定位于层状伪足的 PHPT1 与细胞层状伪足形成密切相关

为了进一步研究 PHPT1 与细胞层状伪足形成的关系，我们使用抑制细胞层状伪足生成的抑制剂 CK-666 处理细胞，并采用激光共聚焦显微镜实时观察了 PHPT1 的定位改变。结果如图 4 中所示，在没有使用抑制剂 CK-666 的时候，PHPT1 可正常定位于细胞层状伪足的前沿，但随着 CK-666 的加入，PHPT1 在细胞层状伪足前沿的定位受到了抑制，其 GFP 荧光强度逐渐消失，到 20 分钟时，基本消失不见。表明随着细胞层状伪足受到抑制，PHPT1 在细胞层状伪足的定位受到了极大的影响，推测 PHPT1 可能与细胞层状伪足形成密切相关。

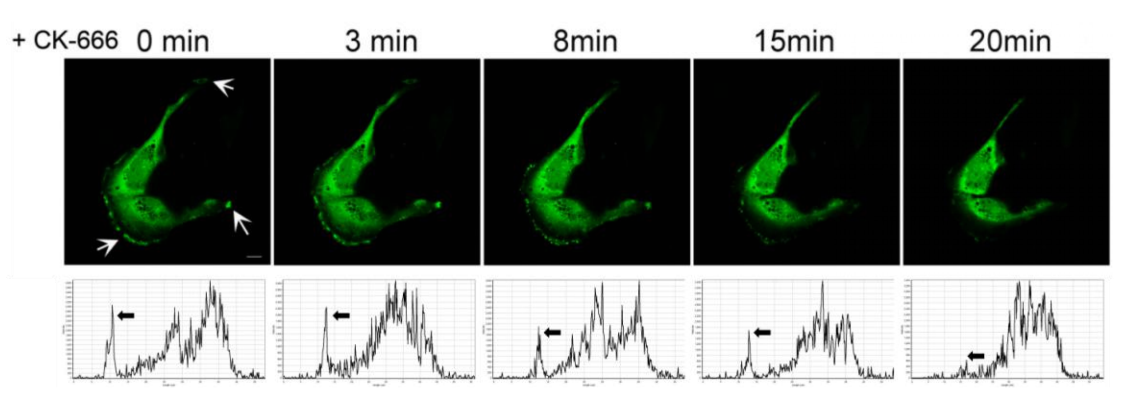


图 4. PHPT1 与细胞层状伪足形成密切相关。Fig4. The relationship of PHPT1 and lamellipodia. Green: PHPT1. Up panel, Select time points shown the localization of PHP14 gradually disappeared at the leading edge after CK-666 treatment; Low panel, the fluorescence intensity analysis. Arrow, the fluorescence intensity analysis of PHPT1 in lamellipodia. Scale bar 40 μm.

2.5 过表达 PHP14 可促进 HeLa 细胞的体外运动能力

基于以上实验，我们已初步确认 PHP14 通过影响细胞层状伪足形成，与细胞运动存在这密切的关系。接下来，我们进一步通过划痕修复实验，检测了过表达 PHP14 的 HeLa 细胞体外运动能力的改变情况。如图 5 所示，在 HeLa 细胞中过表达 PHP14 后，虽然在第 4 小时并没有明显促进 HeLa 细胞的运动能力，在从第 8 小时开始，过表达 PHP14 的 HeLa 细胞的运动能力明显增强，在第 24 小时时，过表达 PHP14 的 HeLa 细胞几乎完全覆盖了整个划痕区域，而未过表达 PHP14 的 HeLa 细胞仍存在明显的划痕区域。这更清楚直接的说明了 PHP14 对细胞运动的调节作用，而这一作用可能是通过影响细胞层状伪足形成而实现的。

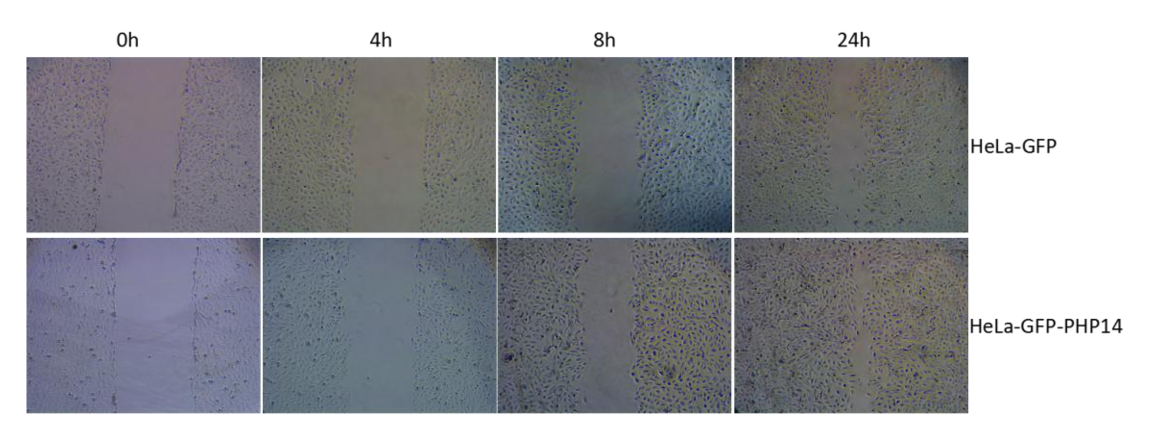


图 5. 过表达 PHP14 可促进 HeLa 细胞的体外运动能力。Fig5. PHP14 over-expression promoted the cell motility of HeLa cells. A wound healing assay was also performed to compare cell motility between HeLa-GFP and HeLa-GFP-PHP14 cells. Closure of the wound was almost complete in HeLa-GFP-PHP14cells within 24 h of incubation, but the wound still existed in HeLa-GFP cells.

3. 讨论

组氨酸磷酸酶蛋白 PHPT1 是真核细胞中发现的第一个具有组氨酸磷酸酶功能的蛋白[1,2]。随着研究的深入，对其生理生化功能已有部分了解。但对于其在细胞中的亚细胞定位，目前还未见报道。

通过 PHPT1 的相互作用蛋白 ATP 循环裂解酶和 G 蛋白的β亚基，以及 HSP90α的细胞内定位情况，我们可以部分推断，PHPT1 可能在细胞质和膜系统中存在定位。而我们在在肺癌组织中对 PHPT1 免疫组织化学染色发现，PHPT1 不仅存在于细胞质中，而且在细胞核中也有分布[9]。但由于免疫组化方法分辨率不高，未能对 PHPT1 在胞内的亚细胞定位进行更深入的研究。但鉴于 PHPT1 在细胞中的重要作用，特别是在肿瘤的发生和发展中的重要作用，有必要对其在细胞内的亚细胞定位进行更精细的研究。

为此，本研究构建了 PHPT1 的 GFP 融合真核表达载体，以通过分子生物学的手段对 PHPT1 的亚细胞定位进行了深入的研究。通过分辨率更高的激光共聚焦影像学分析发现，

PHPT1 不仅具有细胞质和细胞核的亚细胞定位，其还可定位于细胞的层状伪足前沿。我们以前的研究发现，PHPT1 可以影响细胞的运动和迁移能力，但其具体机制还不明确[5]。通过本文的研究，我们直观的观察到了其与细胞运动的密切关系。因为细胞层状伪足作为细胞运动的一种重要结构，对细胞的运动包括肿瘤细胞的转移等生物学功能有着重要的影响。因此，我们推测，PHPT1 在细胞层状伪足前沿的定位可能与细胞层状伪足的形成有着密切的联系。

接下来，我们通过活细胞实时观察，探讨了 PHPT1 与细胞层状伪足之间的关系。通过细胞层状伪足抑制剂 CK-666 抑制细胞层状伪足，再同时实时观察 PHPT1 的定位情况。令人惊奇的，随着细胞层状伪足受到抑制，PHPT1 在细胞层状伪足前沿的荧光强度逐渐降低，在 20 分钟左右，已基本消失。表明 PHPT1 的确与细胞层状伪足的形成密切相关，而这也可能是 PHPT1 调控细胞运动迁移的可能机制之一。

通过对 PHPT1 的细胞内定位分析研究，使我们对 PHPT1 有了更深入的了解，这对我们阐明 PHPT1 在细胞，甚至肿瘤中的功能或作用机制提供了帮助。

基金：北京优秀人才培养项目 (no. 2016000021469G227); 北京友谊医院院启动项目 (no. yyqdkt201516)。

The location of GFP fused PHPT1 and its effect on lamellipodia formation

Anjian Xu[1], Yanmeng Li[1], Shanna Wu[2], Siwen Li[1], Bei Zhang[1], Jian Huang[1]

1. Experimental Center, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100875, P. R. China

2. Clinical Laboratory Center, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100875, P. R. China

Abstract Objective: To amplify human PHPT1 gene, and construct the C-terminal GFP fused vectors, investigate the expression and location of the fusion proteins in cells, as well as the relationship with lamellipodia. Methods: The cDNA sequence of PHPT1 gene was amplified and subcloned into pEGFP-N2 vectors. Transfecting of those vectors into HeLa cells to investigating the location statue of PHPT1 using Laser scanning confocal microscope, and further studied the relationship of PHPT1 location with lamellipodia formation. Results: The pEGFP-N2-PHPT1

prokaryotic expression vectors was constructed successfully and the location of PHPT1 in lamellipodia was closely related to lamellipodia formation. Conclusion: C-terminal GFP fused PHPT1 were expressed in the nucleus and the cytoplasm, especially in the leading edge of lamellipodia, and this location was closely related to lamellipodia formation and cell motility.

Key words　PHPT1; GFP fused expression; location analysis; lamellipodia

参考文献：

[1] Pia Ek, Pettersson G, Bo Ek, et al. Identification and characterization of a mammalian 14-kDa phosphohistidine phosphatase. Eur J Biochem, 2002, 269:5016–5023

[2] Klumpp S, Hermesmeier J, SelkeD, et al. Protein histidine phosphatase: a novel enzyme with potency for neuronal signaling. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22:1420–1424

[3] Ma R, Kanders E, Sundh UB, et al. Mutational study of human phosphohistidine phosphatase: Effect on enzymatic activity. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337:887-891

[4] Steeg P, Palmieri D, Ouatas T,et al. Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer. Cancer Lett, 2003, 190:1–12

[5] Xu AJ, Hao J, Zhang Z, et al. 14-kDa phosphohistidine phosphatase and its role in human lung cancer cell. Lung Cancer, 2010, 67: 48-56

[6] Klumpp S, Bechmann G, Maurer A, et al. ATP-citrate lyase as a substrate of protein histidine phosphatase in vertebrates. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306:110–115

[7] Maurer A, Wieland T, Meissl F,, et al. The b-subunit of G proteins is a substrate of proteinhistidine phosphatase. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334:1115–1120

[8] 徐安健，蒋单懿，黄凌云，等人．人组氨酸磷酸酶 PHP14 的原核表达及其与 Hsp90 的体外互作研究．中国生物工程杂志, 2010, 30(7) : 7-11

Xu AJ, Jiang SY, Huang LY, et al. Prokaryotic Expression, Purification of human 14-kDa phosphohistidine phosphatase and its interaction with HSP90 in vitro. China Biotechnology, 2010, 30(7) : 7-11

[9] Xu AJ, Xia XH, Gu JC, et al. Clinical significance of PHPT1 in lung cancer. Chinese Medical Journal, 2010,123(22):3247-3251